Simplexa™ BKV

REF MOL2300
Rev. E

Ein Real-Time-PCR-Assay zur quantitativen *In-vitro*-Bestimmung des BK-Virus (BKV).

***In-vitro*-Diagnostikum**

ANWENDUNGSBEREICH

Der Simplexa BKV-Assay von Focus Diagnostics dient der quantitativen *In-vitro*-Bestimmung der Nukleinsäuren des BK-Virus (BKV) im Urin und/oder Plasma mit dem Integrated Cycler von 3M.

Dieser Assay ist für die Verwendung in Verbindung mit dem klinischen Bild sowie anderen Laborparametern des Krankheitsverlaufs als Hilfsmittel zur Behandlung von mit BKV infizierten Patienten bestimmt.

Der Assay ist nicht zum Screening von Spendern vorgesehen. Der Assay darf nur fachgerecht eingesetzt werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Das BK-Virus (BKV) gehört zu den humanen Polyomaviren und ist ein unbehülltes Virus mit einem zirkulären, doppelsträngigen DNA-Genom von 5.300 bp. Das BKV wurde erstmalig 1971 im Urin eines nierentransplantierten Patienten isoliert und als Mitglied der Familie *Polyomaviridae* identifiziert. Im Erwachsenenalter beträgt die Seroprävalenz weltweit 70 % bis 90 %.[1] Meist kommt es vor dem vierten Lebensjahr zur Serokonversion.[2-7] Die Virämie bei Primärinfektion führt zur Besiedelung der Nieren, wo das Virus eine klinisch latente Infektion hervorrufen kann.[8] Üblicherweise „schlummert" das Virus, doch kann es in bestimmten Patientenpopulationen, beispielsweise bei immunsupprimierten Patienten oder Schwangeren, immer wieder zur Reaktivierung kommen. Diese Reaktivierung kann sich vielfältig manifestieren und reicht von einer subklinischen Virämie und Virurie bis hin zur Nephropathie und Ureterstenose nach Nierentransplantation. Eine offenkundige klinische Erkrankung als Folge einer BKV-Infektion ist selten, korreliert aber mit dem Grad der Immunsuppression.

Derzeit stellt die PCR das einzige zuverlässige Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung des BKV dar. Bedingt durch das langsame Wachstum und die Notwendigkeit spezieller Zelllinien liefert die Anzüchtung des Virus nur selten zeitnahe hilfreiche Informationen zur Behandlung der Patienten.[9] Serumassays sind ebenfalls kaum von Nutzen, da ein Großteil der Bevölkerung seropositiv für das BKV ist und die Erkrankung aus der Reaktivierung der latenten Infektion resultiert.[10]

GRUNDLAGEN DES VERFAHRENS

Bei dem Test handelt es sich um ein Real-Time-PCR-System zur Amplifikation und Detektion. Der DNA-Nachweis des BK-Virus im Urin und Plasma erfolgt durch eine bifunktionelle fluoreszierende Primersonde. Der Test besteht im Wesentlichen aus zwei Schritten: (1) Extraktion von DNA aus Patientenproben, (2) Amplifizierung eines spezifischen Zielmoleküls (in jedem Analyt und der internen Kontrolle) mithilfe einer bifunktionellen fluoreszierenden Primersonde und eines Rückwärts-Primers. Der Assay liefert eine Zahl als Ergebnis; die virale DNA in der Probe wird über eine gut konservierte Zielregion im VP2-Gen des BKV-Genoms identifiziert. Zur Überprüfung der Extraktion und zur Erkennung einer Hemmung der PCR wird eine interne Kontrolle mitgeführt. Das aus jeder Probe gewonnene Amplifikationssignal wird mit einer Kalibrierkurve verglichen und quantifiziert.

MITGELIEFERTES MATERIAL

Das Simplexa™ BKV-Kit von Focus Diagnostics enthält ausreichend Reagenzien für 100 Bestimmungen.

Beschreibung des Kits

Bezeichnung der Komponente	REF	EG-SYMBOL AUF ETIKETT		Kurzbezeichnung	Deckelfarbe	Anzahl Fläschchen	Reaktionen pro Gefäß/Kit	Volumen pro Fläschchen
Simplexa™ BKV Primer Mix	**MOL2301**	**REAG**	**A**	**PM**	Braun	2	50/100	50 µl
Simplexa™ Master Mix	**MOL2000**	**REAG**	**B**	**MM**	Grün	2	50/100	200 µl
Simplexa Extraction & Amplification Control DNA	**MOL9001**	**CONTROL**	**IC**	**IC**	Blau	3	50/150	250 µl
Simplexa™ BKV Low Positive Control	**MOL2302**	**CONTROL**	**+**	**LPC**	Weiß	6	1/6	200 µl
Simplexa™ BKV High Positive Control	**MOL2303**	**CONTROL**	**++**	**HPC**	Rot	6	1/6	200 µl

Beschreibung der Komponente

<table>
<tr><th>Kit-Komponente</th><th>Beschreibung</th></tr>
<tr><td>Simplexa™ BKV Primer Mix (PM) (Primer-Mix)</td><td>Mit fluoreszierendem Farbstoff markierte Primer zur spezifischen Quantifizierung des BKV und der internen Kontrolle.
<table>
<tr><th>Target</th><th>Sonden-Fluorophor (Farbstoff)</th><th>Exzitation</th><th>Emission</th><th>Zielgen</th></tr>
<tr><td>BKV</td><td>FAM</td><td>495 nm</td><td>520 nm</td><td>VP2-Gen</td></tr>
<tr><td>Interne Kontrolle</td><td>Q670</td><td>644 nm</td><td>670 nm</td><td>A. thaliana-Gen</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>Simplexa™ Master Mix (MM) (Master-Mix)</td><td>DNA-Polymerase, Puffer und dNTPs.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ Extraction & Amplification Control DNA (IC) (DNA für die Extraktions- und Amplifikationskontrolle)</td><td>Ein 577 Basenpaare umfassendes DNA-Fragment aus dem Gen, das die N-Methyltransferase der großen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase der Pflanze Arabidopsis thaliana kodiert.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ EBV Positive Control (LPC) (Niedrigpositiv-Kontrolle)</td><td>BKV-Amplicon in humaner Basismatrix.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ EBV High Positive Control (HPC) (Hochpositiv-Kontrolle)</td><td>BKV-Amplicon in humaner Basismatrix.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ EBV Barcode Card (Barcode-Karte)</td><td>Test-spezifische Parameter</td></tr>
</table>

ERFORDERLICHES, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

1. Simplexa™ BKV Quantitation Standard Set (REF MOL2310)
2. 3M Integrated Cycler mit Integrated Cycler Studio-Software, Version 3.0 oder höher
3. Universal Discs zur Verwendung auf dem Integrated Cycler
4. Universal Disc-Abdeckfolie
5. [a] Roche MagNA Pure LC und zugehöriges Verbrauchsmaterial
6. [a] Roche MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Kat.- Nr. 3038505001)
7. [b] NucliSENS® easyMAG™ Gerät von bioMérieux und dazugehörige(s) Verbrauchsmaterial und Reagenzien
8. [b] Biohit/bioMerieux Mehrkanalpipette
9. [b] ELISA-Streifenplatte
10. Ein-, Mehrkanalmikropipette(n) und/oder Repetiermikropipette(n) mit einem Genauigkeitsbereich von 1-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl
11. Gefrierschrank, -10 °C bis -30 °C (mit manueller Abtaufunktion), für die Lagerung der gefrorenen Kit-Komponenten
12. Gefrierschrank, -10 °C bis -30 °C (mit manueller Abtaufunktion), für die Lagerung der gefrorenen Proben
13. Kühlschrank mit 2 °C bis 8 °C (für Proben und aufgetaute Kit-Komponenten)
14. Biologische Sicherheitswerkbank (Laminarflow-Haube) für die Durchführung der Extraktionen
15. Mikrozentrifuge
16. Vortex-Mischer
17. Sterile, RNase/DNase-freie Einmalpipettenspitzen mit Aerosolbarriere
18. 1,5 ml Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen und Ständer (RNase-/DNase-freie Röhrchen werden empfohlen, sind aber nicht vorgeschrieben)
19. Einweg-Schutzhandschuhe (ungepudert)
20. Nukleasefreies Wasser (zur Extraktion und als Leerwert-Kontrolle (NTC, No-Template Control))
21. Kühlständer für 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen

[a] Zur Verwendung beim Roche MagNA Pure LC-Extraktionsverfahren
[b] Zur Verwendung beim bioMerieux easyMAG-Extraktionsverfahren

HALTBARKEIT UND HANDHABUNG

1. Reagenzien bei -10 bis -30 ℃ aufbewahren (keine Gefriergeräte mit Abtauautomatik verwenden).
2. Reagenzien vor Gebrauch bei Raumtemperatur auftauen lassen (Temperaturbereich ca. 18 °C bis 25 °C).
3. Kits und Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
4. Das Reaktionsgemisch nach Zugabe des Master-Mix innerhalb einer Stunde verwenden. Das Reaktionsgemisch bei 2 °C bis 8 °C lagern, bis die PCR angesetzt werden kann.
5. Nach dem ersten Auftauen können Primer-Mix, Master-Mix und DNA für die Extraktions- und Amplifikationskontrolle maximal 30 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden.

6. Primer-Mix, Master-Mix, Positivkontrollen und DNA für die Extraktions- und Amplifikationskontrolle nicht wieder einfrieren.
7. Keine Reagenzien aus verschiedenen Kitchargen kombinieren.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. *In-vitro*-Diagnostikum
2. Alle Humanmaterialien sollten als potentiell infektiös behandelt werden. Das Ursprungsmaterial dieses Produktes (einschließlich der Kontrollen) ist mit US-FDA- anerkannten Methoden auf HBs-Antigen, Hepatitis C-Antikörper und HIV-1/2 (AIDS) Antikörper untersucht und für negativ befunden worden. Dennoch gewährleistet keine der bekannten Testmethoden absolute Garantie dafür, dass Produkte, die aus menschlichem Blut gewonnen wurden, die genannten oder andere infektiöse Krankheiten nicht übertragen können. Alle Kontrollen, Serumproben und Geräte, die in Kontakt mit den Proben kommen, sollten daher als potentiell infektiös angesehen und durch entsprechende biologische Sicherheitsmaßnahmen dekontaminiert oder entsorgt werden. Die amerikanischen CDC und NIH empfehlen, dass möglicherweise infektiöse Substanzen entsprechend Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.[11,12]
3. Beim Umgang mit den Kit-Reagenzien persönliche Schutzausrüstung wie (jedoch nicht beschränkt auf) Handschuhe und Laborkittel tragen. Hände nach der Durchführung des Tests gründlich waschen.
4. Nicht mit dem Mund pipettieren.
5. In Bereichen, in denen Kit-Reagenzien und/oder Humanproben gehandhabt werden, darf nicht geraucht, getrunken und gegessen werden. In diesen Bereichen sollten auch keine Kontaktlinsen eingesetzt/herausgenommen und kein Make-up aufgetragen werden.
6. Nicht verwendete Kit-Reagenzien bzw. Humanproben gemäß den örtlichen und nationalen Bestimmungen entsorgen.
7. Der Arbeitsablauf im Labor sollte nur in einer Richtung erfolgen: ausgehend vom/von den Prä-Amplifikationsbereich(en) in Richtung Amplifikations-/Detektionsbereich: Im folgenden Abschnitt wird der Ablauf der Arbeitsschritte von der Probenextraktion bis zur Amplifikation mittels Real-Time-PCR beschrieben:
   - Am Anfang steht die Probenextraktion, gefolgt von der Einstellung des Geräts zur Durchführung der Real-Time-PCR, der Zubereitung der Reagenzien und schließlich der Amplifikation mittels Echtzeit-PCR.
   - Die Verbrauchsmaterialien und Instrumente dürfen nicht bereichsübergreifend zwischen den speziellen Probenextraktions- und Probenvorbereitungsbereichen verwendet werden. Sie sollten auch nicht zwischen den verschiedenen Bereichen ausgetauscht werden.
   - Verbrauchsmaterial und technische Ausstattung für die Probenvorbereitung dürfen nicht für die Reagenzienzubereitung oder zum Bearbeiten amplifizierter DNA oder anderer Quellen der Zielnukleinsäure verwendet werden.
   - Sämtliches Verbrauchsmaterial und sämtliche technischen Vorrichtungen für die Amplifikation müssen immer im Bereich des Real-Time-PCR-Geräts verbleiben.
   - Auch die persönliche Schutzausrüstung, wie z B. Laborkittel und Einmalhandschuhe, sollten bereichsspezifisch gehandhabt werden.
8. Die Kontamination von Reagenzien bzw. Patientenproben kann zu einer Verfälschung der Testergebnisse führen. Unter aseptischen Bedingungen arbeiten.
9. Die Reagenzien vorsichtig pipettieren und handhaben, um eine Kontamination mit Material aus benachbarten Kavitäten zu verhindern.
10. Geeignete Pipettiertechniken anwenden und für die Dauer des Tests das gleiche Pipettierschema einhalten, um optimale und reproduzierbare Werte zu erhalten.
11. Die Reagenzien nicht gegen Reagenzien anderer Kit-Chargen oder anderer Hersteller austauschen oder mit diesen mischen.
12. Die Verschlusskappen der Reagenzröhrchen nicht vertauschen. Dies könnte zur Kontamination führen und die Testergebnisse beeinträchtigen.
13. Nur das in diesem Beipackzettel beschriebene Protokoll verwenden. Bei Nichteinhaltung des Protokolls oder der angegebenen Zeiten sowie Temperaturen kann es zu fehlerhaften Testergebnissen kommen.
14. Der Testansatz sollte bei Raumtemperatur (Temperaturbereich ca. 18 °C bis 25 °C) erfolgen. Beim Mischen der Reagenzien die Enzyme durch einen Kühlblock gekühlt halten.
15. Universal Discs, die bereits in Kontakt mit Patientenproben oder Reagenzien gekommen sind, nicht wieder verwenden.
16. Gebrauchte Discs ohne Abnehmen oder Entfernen der Abdeckfolie entsorgen.
17. Wenn verschiedene Simplexa™ Kits auf der gleichen Disc angesetzt werden, müssen die Positiv- und Leerwert-Kontrollen aus jedem verwendeten Kit getestet werden.
18. Der Master-Mix enthält >1 % Glycerin, welches bei Einatmen oder Hautkontakt zu Reizungen führen kann. Nach Einatmen oder Berührung sollten Erste-Hilfe-Maßnahmen eingeleitet werden.
19. Eine längere Aufbewahrung extrahierter Proben bei 2 °C bis 8 °C wird nicht empfohlen; die Leistung wurde unter diesen Bedingungen nicht geprüft.
20. Das Kit bei offensichtlich angebrochener oder beschädigter Verpackung bzw. angebrochenem oder beschädigtem Inhalt nicht verwenden und Focus Diagnostics kontaktieren. Kontaktadressen befinden sich auf der letzten Seite dieses Dokuments.

GEBRAUCHSANWEISUNG

A. PROBENGEWINNUNG

Hierfür geeignet sind Urin- und Plasmaproben. Bei Plasmaproben keine Probenröhrchen mit Heparin als Antikoagulans verwenden. Heparin inhibiert die PCR.

B. PROBENEXTRAKTIONSBEREICH

In einem speziellen, der Extraktion von Proben und Kontrollen vorbehaltenen Bereich arbeiten. Die Vorbereitung der Proben für die Extraktion wird auf einer biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Extraktion mit dem MagNA Pure LC-Extraktionsverfahren von Roche

1. Die Extraktion von Nukleinsäuren aus Patientenproben und Assaykontrollen erfolgt mit dem Roche MagNA Pure Total Nucleic Acid-Kitund dem Roche MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid Extractor-Gerät. Hinsichtlich der Nukleinsäureextraktion mit diesem Kit die Gebrauchsanweisungen des Herstellers beachten.
2. Im Dropdownmenü „Protocol“ des MagNA Pure LC-Systems die Optionen „Total NA“ und anschließend „Total NA Variable_elution_volume.blk“ wählen. Damit werden die passenden Einstellungen für den Lauf geladen.
3. Das Probenprotokoll sollte „Total NA Variable_elution_volume“ sein.
4. Als Probenvolumen sollte 200 µl und als Elutionsvolumen 50 µl eingestellt sein.
5. Das Verdünnungsvolumen sollte für alle Proben auf Null eingestellt sein.
6. Das „Post Elution Protocol“ muss auf „None“ eingestellt sein.
7. Darauf achten, dass Proben und Kontrollen sich auf der Probeneinsatz an der richtigen Position befinden.
8. Jede Probe, Niedrigpositiv- und Hochpositiv-Kontrolle 2-4 Sekunden vortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
9. 200 µl von jeder Probe, Niedrig- und Hochpositiv-Kontrolle sowie Leerwert-Kontrolle in die entsprechende Position der Probeneinsatz pipettieren.
10. Den Füllpegel der Proben und Kontrollen in der Probeneinsatz einer Sichtprüfung unterziehen, um sicherzustellen, dass Probe(n) zugegeben wurde(n).
11. Die DNA zur Extraktions- und Amplifikationskontrolle zweimal pulsvortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
12. Für je 16 Proben (1-16 Proben) 100 µl der (IC) in 6 ml Lysepuffer in ein konisches Röhrchen pipettieren. Kurz auf dem Vortex mischen. In das entsprechende Fach des MagNA Pure Extraktionsgerätes geben.
    - Werden beispielsweise mehr als 16 Proben (17-32 Proben) extrahiert, müssen 200 µl der IC in 12 ml Lysepuffer in ein konisches Röhrchen pipettiert werden. Kurz auf dem Vortex mischen. In das entsprechende Fach des MagNA Pure Extraktionsgerätes geben.
13. Die Probeneinsatz in das MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid-Extraktionsgerät überführen und die Extraktion starten.
14. Nach Abschluss der Nukleinsäureextraktion kann die Kartusche mit den extrahierten Kontrollen und Patientenproben aus dem MagNA Pure-Extraktor herausgenommen und verschlossen werden. Die extrahierte DNA vor der Verwendung bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren. Die Langzeitauflagerung extrahierter Proben bei dieser Temperatur wird nicht empfohlen. Extrahierte DNA-Proben beim Laden der Disc auf einem Kühlblock aufbewahren.

Extraktion mit dem NucliSENS® easyMAG™-Extraktionsverfahren von bioMérieux

1. Zur Bedienung von Gerät und Software ist das Benutzerhandbuch des NucliSENS® easyMAG™ zu beachten.
2. In der NucliSENS® easyMAG™ Software die Vorlage „Generic“ [Allgemein] mit folgenden Einstellungen wählen:
   Default Request [Standardanfrage]: Generic 2.0.1 (oder äquivalent)
   Run Name Prefix [Anfangskode der Laufbezeichnung: (beliebig)
   Sample ID prefix [Anfangskode der Proben-ID]: (beliebig)
   Sample Type [Probentyp]: Primary [Primär]
   Workflow Defaults [Standardarbeitsabläufe]: On-board lysis Incubation [Lyse-Inkubation im Gerät]
   On-board Silica Incubation [Inkubation mit Silica im Gerät]
   Sample Addition Guidance Off [Hinweise zur Zugabe von Proben Aus]
   Reagent Tracking [Rückverfolgung der Reagenzien]: Lysis, Silica, Internal Control reagent tracking disabled [Rückverfolgung von Lyse-Reagenz, Silica und interner Kontrolle deaktiviert]
3. Die individuellen Probendaten in der Bildschirmmaske „Extraction Request“ [Extraktionsanforderung] wie folgt eingeben:
   Sample ID [Proben-ID]: (Probenbezeichnung eingeben)
   Request [Anfrage]: Generic 2.0.1 (oder äquivalent)
   Volume [Volumen] (mL): 0,200
   Eluate [Eluat] (µL): 50
   Type [Typ]: Primary [Primär]
   Priority [Priorität]: Normal
   Matrix: Other [Andere]
4. Nach den Angaben im Benutzerhandbuch in der NucliSENS® easyMAG™ Software einen „Extraction Run“ [Extraktionslauf] erstellen.
5. Jede Probe, Niedrigpositiv- und Hochpositiv-Kontrolle 2-4 Sekunden vortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
6. 200 µl der Probe, der Niedrig-/Hochpositiv- und der Leerwert-Kontrolle in Probengefäße pipettieren.
7. Die interne Kontrolle zweimal (2x) pulsvortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
8. In jede Proben- und Kontroll-Kavität 5 µl interne Kontrolle pipettieren. Bei jeder Kavität die Pipettenspitze wechseln.
9. Nach den Angaben im Benutzerhandbuch das/die Probengefäß(e), neue Verbrauchsmaterialien für den Aspirator und die Reagenzien in das easyMAG™ Gerät laden.

10. Die Lyse im Gerät starten und die lysierten Proben 10 Minuten inkubieren, bevor das magnetische Silica-Gemisch zugegeben wird.
11. Das magnetische Silica-Gemisch während der Lyse-Inkubation vorbereiten. Silica durchmischen und mit nukleasefreiem Wasser verdünnen, indem 1 Teil magnetisches Silica zu 3 Teilen nukleasefreiem Wasser gegeben wird (z. B. 270 µl magnetisches Silica + 810 µl nukleasefreies Wasser). Je Probe mindestens 135 µl magnetisches Silica-Gemisch vorbereiten.
12. Zum Übertragen des Silica-Gemisches in die Kavitäten der ELISA-Streifen das magnetische Silica-Gemisch anmischen und 1 Spitze sowie den Betriebsmodus P2 der Biohit-Pipette verwenden. Auf **Start** drücken, um 1050 µl des magnetischen Silica-Gemisches anzusaugen, und nochmals auf **Start** drücken, um das erste Volumen zurück in das Röhrchen mit Silica-Gemisch auszuwerfen. Auf **Start** drücken, um je 125 µl des magnetischen Silica-Gemisches in 8 einzelne Kavitäten des ELISA-Streifens zu pipettieren. Bedarfsweise für weitere ELISA-Streifen wiederholen.
13. Nach der 10-minütigen Lyseinkubation 8 Spitzen (je ELISA-Streifen) und den Betriebsmodus P3 der Biohit-Pipette verwenden, um jeder Probe im Probengefäß 100 µl des magnetischen Silica-Gemisches zuzusetzen. Die Spitzen in die Kavitäten der ELISA-Streifen geben und **Start** drücken, um das magnetische Silica-Gemisch zu mischen und anzusaugen.
14. Das magnetische Silica-Gemisch in das jeweilige Probengefäß geben und die Pipettenspitze(n) in die Proben eintauchen. Sie sollten sich unterhalb des Flüssigkeitsspiegels befinden. Auf **Start** drücken, um durch ansaugen und wieder abgeben das magnetische Silica mit den Proben zu mischen (3x). Die Pipettenspitzen müssen unterhalb des Flüssigkeitsspiegels bleiben, damit der Mischvorgang korrekt ausgeführt wird.
15. Für jedes weitere Probengefäß Schritt 13 und 14 wiederholen.
16. Nach Zugabe des magnetischen Silica-Gemisches zu allen Probengefäßen den Extraktionslauf starten.
17. Nach Abschluss des Laufs das(die) Probengefäß(e) aus dem Gerät nehmen. Werden die Proben nicht sofort weiterverarbeitet, sind sie in individuelle Röhrchen zu überführen, um das Risiko, dass magnetisches Silica zurück in die Probe fällt, zu minimieren. Die extrahierte DNA bis zum Gebrauch bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren. Die Langzeitlagerung extrahierter Proben bei dieser Temperatur wird nicht empfohlen. Extrahierte DNA-Proben beim Beschicken der Disc auf einem Kühlblock aufbewahren.

C. EINSTELLUNG DES GERÄTS FÜR DIE REAL-TIME-PCR

1. Einzelheiten darüber, wie die Integrated Cycler Studio Software zu konfigurieren ist, um eine Assaydefinition hinzuzufügen, einen Lauf einzustellen und die Läufe auf dem Integrated Cycler zu analysieren, sind der Bedienungsanleitung des Integrated Cycler zu entnehmen.

Hinweis: Vor Durchführung eines Vorhersagelaufes muss eine valide Standardkurve (Kalibrierungslauf) eingerichtet werden.

D. REAGENZIENZUBEREITUNGSBEREICH

Ein für die Vorbereitung des Reaktionsgemisches für den Simplexa™ BKV-Assay reservierter Bereich.

1. Primer-Mix und Master-Mix bei Raumtemperatur (etwa 18 °C bis 25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen im Kit enthält eine für 50 Reaktionen ausreichende Reagenzienmenge. Vor jedem Gebrauch die Primer-Mix- und Master-Mix-Komponenten durch sechs- bis achtmaliges vorsichtiges Umdrehen durchmischen und dann kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
2. In ein Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen entsprechender Größe jede Komponente in dem in der folgenden Tabelle angegebenen Volumen pipettieren, um das erforderliche Volumen des Reaktionsgemisches zuzubereiten.

Reaktionsgemischvolumen

Reagens	Reaktionsgemisch-Volumen / 1 Reaktion	Reaktionsgemisch-Volumen / 10 Reaktionen
Simplexa™ Master Mix	4,0 µl	40 µl
Simplexa™ BKV Primer Mix	1,0 µl	10 µl
Gesamtvolumen	5,0 µl	50 µl

3. Das Reaktionsgemisch durch Umdrehen des Röhrchens oder durch 8- bis 10-maliges Pipettieren vorsichtig mischen.
4. Kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
5. Mit der Vorbereitung der PCR fortfahren.
6. Das Reaktionsgemisch innerhalb einer Stunde nach Zubereitung verwenden. Sofern die PCR-Vorbereitung nicht sofort nach dem Ansetzen des Reaktionsgemisches erfolgt, sollte dieses bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

E. BEREICH FÜR DIE REAL-TIME-PCR-AMPLIFIKATION

In einem speziellen, der Vorbereitung der Universal Disc mit 96 Kavitäten für den Simplexa™ BKV-Assay vorbehaltenen Bereich arbeiten.

Bei der Durchführung folgender Vorbereitungsschritte das beispielhafte Disc-Layout in Abschnitt C beachten:

1. In jede Kavität 5,0 µl des Reaktionsgemischs pipettieren.
2. 5,0 µl der extrahierten Positivkontrollen in die Kavität „HPC und LPC“ pipettieren.
3. 5,0 µl der extrahierten Patientenprobe in die entsprechende Kavität „S“ pipettieren.
4. 5,0 µl der extrahierten Leerwert-Kontrolle in die Kavität „NTC“ pipettieren.
5. Die Disc mit dem Universal Disc Cover Tape abdecken.
6. Den Deckel des Integrated Cycler öffnen.

7. Die verschlossene Universal Disc auf die Platte legen.
8. Den Deckel vorsichtig schließen.
9. Auf **Run [Lauf]** klicken.
10. Auf **Start** klicken.

F. DATENANALYSE

1. Nach Beendigung des Laufs auf **Analyze [Analysieren]** klicken.
2. Die **Farbstoffe** einzeln prüfen oder durch Anklicken des Markierungsfeldes neben jedem Farbstoff alle Farbstoffe (Kanäle) auswählen.
3. Durch Anklicken von **Print Preview [Druckvorschau]** (rechts unten) wird eine Zusammenfassung der prädiktiven Werte ausgegeben. Zur Vorschau der Amplifikationskurven das Häkchen im Markierungsfeld **Include Graphs [Mit Kurven]** setzen. Durch Setzen des Häkchens im Markierungsfeld **Include Calibration Result [Mit Kalibrierungsergebnis]** wird dem Vorhersagelauf der Kalibrierungsbericht hinzugefügt. Die Seiten mithilfe der Pfeiltasten links oben im Fenster Print Preview [Druckvorschau] durchblättern.
4. Den Bericht nach Bedarf Print [Ausdrucken] oder Save [Abspeichern].
5. Die prädiktiven Werte ggf. exportieren.

QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte, ausgehend von den vor Ort geltenden Gesetzen, Bestimmungen und der üblichen guten Laborpraxis eigene Qualitätskontrollbereiche wie auch die Häufigkeit der Qualitätskontrollen ermitteln.

ERSTELLUNG VON ERGEBNISBERICHTEN

1. Laufvalidität

   Durch Überprüfung der BKV- und IC-Ergebnisse für die Niedrigpositiv-Kontrolle (LPC), Hochpositiv-Kontrolle (HPC) und Leerwert-Kontrolle (NTC) die Validität des Laufs ermitteln. Damit der Lauf als valide gilt, müssen alle drei Kontrollen die Akzeptanzkriterien erfüllen. Bei ungültigem Lauf müssen alle Patientenproben erneut getestet werden.

Akzeptanzkriterien

Kontrolle	BKV	DNA für die Extraktions- und Amplifikationskontrolle (IC)
No-Template Control (NTC)	Nicht detektiert	Detektiert
Low Positive Control (LPC)	Innerhalb des Toleranzwertes auf dem chargenspezifischen Etikett	nicht zutreffend
High Positive Control (HPC)	Innerhalb des Toleranzwertes auf dem chargenspezifischen Etikett	nicht zutreffend

- Der Leerwert (NTC) entspricht den Akzeptanzkriterien, falls kein BKV detektiert und die interne Kontrolle (IC) nachgewiesen wurde. Die Detektion von BKV in der Leerwert-Kontrolle zeigt an, dass die Proben möglicherweise während der Verarbeitung kontaminiert wurden.
- Die Niedrigpositiv-Kontrolle (LPC) erfüllt die Akzeptanzkriterien, falls die in der LPC detektierte BKV-Konzentration innerhalb der Toleranzgrenzen (wie auf dem chargenspezifischen Etikett angegeben) liegt. Die IC sollte nachgewiesen werden, dies ist aber nicht zwingend erforderlich.
- Die Hochpositiv-Kontrolle (HPC) erfüllt die Akzeptanzkriterien, falls die in der HPC detektierte BKV-Konzentration innerhalb der Toleranzgrenzen (wie auf dem chargenspezifischen Etikett angegeben) liegt. Die IC sollte nachgewiesen werden, dies ist aber nicht zwingend erforderlich.

2. Interpretation der Ergebnisse

Interpretation der Ergebnisse

Beispiel	BKV-Wert	IC-Wert	Interpretation
1	Nicht detektiert	Detektiert	BKV nicht detektiert
2	< 510 Kopien/ml	n. z.	BKV detektiert, unterhalb LLoQ (Lower Limit of Quantitation)
3	X Kopien/ml	n. z.	BKV-Nachweis in der bestimmten Konzentration
4	> 1×10^8 Kopien/ml	n. z.	BKV detektiert, oberhalb ULoQ (Upper Limit of Quantitation)
5	Nicht detektiert	Nicht detektiert	Ungültig, erneut extrahieren und Test wiederholen

3. Validität der Probenergebnisse

   Eine Probe ist valide, falls entweder

   1. kein BV detektiert und die IC nachgewiesen wurde oder
   2. BKV detektiert wurde. Bei BKV-positiven Ergebnissen muss die interne Kontrolle nicht unbedingt nachgewiesen werden.
   3. Die Amplifikationskurven aller Ergebnisse sind zu überprüfen, insbesondere wenn eine „Data Quality“-Meldung [Datenqualität] vorliegt. Eine gültige Amplifikationskurve zeigt einen glatten exponentiellen Anstieg. Weitere Einzelheiten dazu finden sich im Benutzerhandbuch.

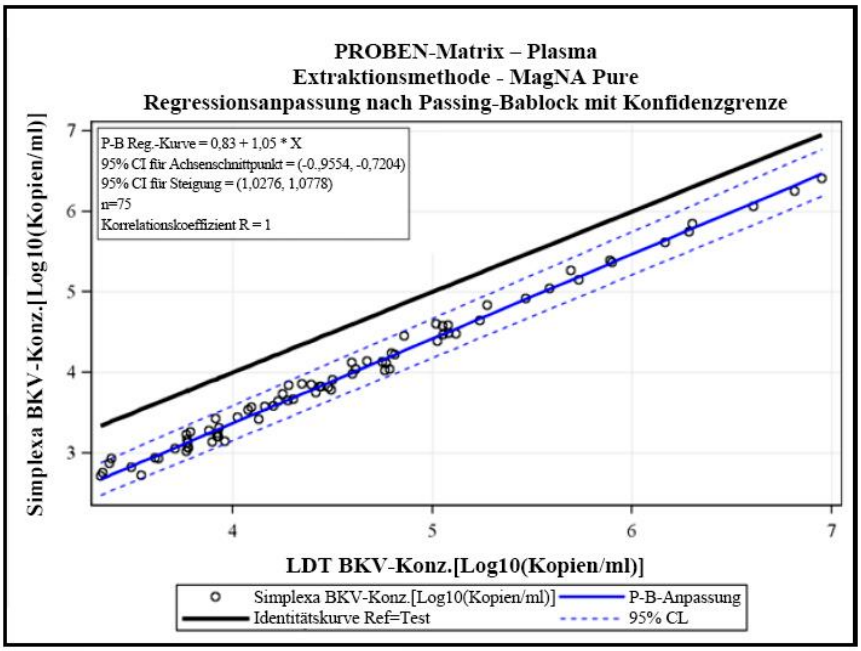
EINSCHRÄNKUNGEN

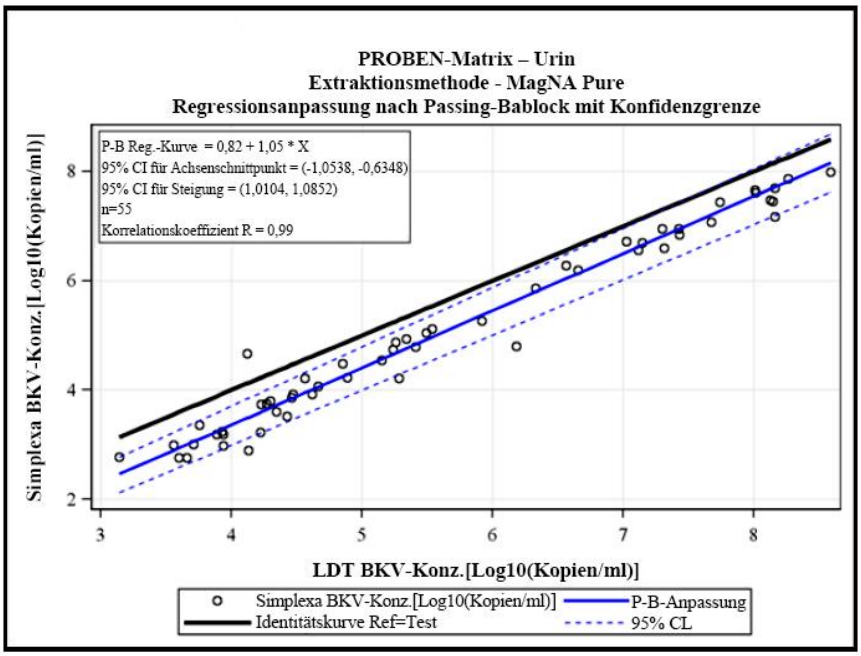
1. Die Personen, die die Analyse durchführen, sollten sich vor Durchführung des Assays eingehend mit den Testverfahren und der Ergebnisinterpretation vertraut gemacht haben.
2. Zur Quantifizierung unbekannter Patientenproben speichert die 3M Integrated Cycler Studio-Software die letzte gültige Kalibrierungsdatei. Die Quantifizierungsstandards und Patientenproben müssen mit der identischen Methodik extrahiert werden, da es ansonsten zu fehlerhaften Testergebnissen kommen kann.
3. Bei der Überwachung eines Patienten **muss** das für die Bestimmung der ersten Probe verwendete Extraktionsverfahren für alle weiteren Bestimmungen verwendet werden.
4. Alle Testergebnisse aus diesen und anderen Tests müssen im Zusammenhag mit der klinischen Anamnese, den epidemiologischen Daten und allen anderen Daten, die dem zuständigen Arzt vorliegen, gesehen werden.
5. Die Prävalenz der Infektion beeinflusst den prädiktiven Wert des Assays.
6. Wie bei anderen Tests auch, schließt ein negatives Ergebnis eine BKV-Infektion nicht aus.
7. Falls der die Infektion verursachende Organismus Genmutationen, Insertionen, Deletionen oder Rearrangements aufweist oder wenn die Testung im Frühstadium der Erkrankung erfolgt, kann es zu falsch negativen Ergebnissen kommen.
8. Falsch negative Ergebnisse können auftreten, wenn in der Probe aufgrund von Fehlern bei Entnahme, Transport oder Verarbeitung zu wenig Erreger vorhanden sind.
9. Wie bei anderen Testverfahren kann es auch hier zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Eine Wiederholung des Tests oder die Durchführung des Tests mit einem anderen Gerät könnte in manchen Fällen indiziert sein.
10. Dieser Assay kann keine Erkrankung ausschließen, die durch andere bakterielle oder virale Erreger verursacht wird.
11. Die Leistung dieses Assays wurde nicht für das Screening von Urin oder Plasma auf das Vorliegen von BKV bestimmt.
12. Dieser Assay ist nicht als Screeningtest oder Diagnostikum zum Nachweis des Vorliegens von BKV in Urin oder Plasma bestimmt.
13. Die Leistungsfähigkeit dieses Assays bezüglich möglicherweise interferierender endogener oder exogener Substanzen wurde nicht ermittelt.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSDATEN

METHODENVERGLEICH

An der Studie zur klinischen Übereinstimmung nahm eine interne Prüfstelle teil. Die Referenzwerte wurden mit Hilfe eines im Labor entwickelten Hochleistungstests (LDT, Laboratory Developed Test) erstellt. Die Studie zur BKV-Detektion und -Quantifizierung untersuchte 150 Plasma- und 125 Urinproben. Die Probenextraktion erfolgte mit dem MagNa Pure-Extraktionsverfahren. Die in die Auswertung einfließenden Proben (Plasma: 75; Urin: 55) lagen innerhalb des kombinierten Messbereiches des Referenz-LDT und des Simplexa BKV-Assays. Die Passing-Bablock-Regression ergab für Plasma eine Steigung von 1,05 sowie einen Achsenabschnitt von -0,83 und für Urin eine Steigung von 1,05 sowie einen Achsenabschnitt von -0,82.





Klinische Proben mit Ergebnissen im linearen Bereich des Simplexa BKV-Assays wurden auch mittels easyMAG-Extraktion getestet. Diese Proben verhielten sich äquivalent zu den mit MagNA Pure extrahierten Proben (für Plasma ergab sich eine Steigung von 0,98 sowie ein Achsenabschnitt von -0,03 und für Urin eine Steigung von 1,06 sowie ein Achsenabschnitt von -0,4).

ANALYSEEMPFINDLICHKEIT / NACHWEISGRENZE

Die Nachweisgrenze (LoD, Limit of Detection) errechnete sich aus künstlichen Proben eines BKV-Stammes mit bekannter Bestandskonzentration, der einer klinisch negativen Plasma- bzw. Urinmatrix zugesetzt wurde. Die Probengruppe umfasste Negativproben (Plasma- und Urinmatrix ohne Zusatz) und seriell verdünnte Proben mit unterschiedlicher Konzentration im Bereich der ungefähren Nachweisgrenze (ermittelt im Rahmen einer früheren Testphase). Zu jeder Kombination aus Extraktionssystem (easyMAG, MagNA Pure) und Probentyp (Plasma, Urin) wurden 24 Kopien aus drei (3) unterschiedlichen Extraktionen und PCR-Läufen für jeden Konzentrationsspiegel mittels Probit-Analyse ausgewertet, um die geringste Konzentration zu ermitteln, die sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % noch genau detektieren ließ. Die Nachweisgrenze wurde für jedes der beiden Extraktionsverfahren sowie für jeden Probentyp ermittelt. Die einzelnen Werte für die Nachweisgrenze sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Basierend auf der höchsten, für alle Extraktionsverfahren und Probentypen ermittelten Nachweisgrenze wurde eine Nachweisgrenze von 510 Kopien/ml festgelegt.

	Plasma		Urin	
	MagNA Pure	**easyMag**	**MagNA Pure**	**easyMag**
Kopien/ml	**510**	**385**	**503**	**253**

ANALYTISCHE REAKTIVITÄT / KREUZREAKTIVITÄT

Aus Studien ist bekannt, dass die Primer BKV-spezifisch sind und keine Kreuzreaktion mit anderen Erregern aufweisen, u. a. mit HIV-1, HIV-2, HSV-1, HSV-2, HHV-6, JCV, VZV, EBV, CMV, *Staphylococcus saprophyticus, Enterococcus, Candida, Enterobacter, Citrobacter, E. coli, Klebsiella* und *Proteus mirabilis*. Weiterhin ist auch aus den Datenbanken der Nukleinsäuresequenzen ersichtlich, dass die Primer BKV-spezifisch sind und keine signifikante Homologie mit anderen Erregern oder menschlicher DNA aufweisen.

INTERFERENZ

Die Leistungsfähigkeit dieses Assays bezüglich möglicherweise interferierender Substanzen wurde nicht ermittelt. Der automatisierte Nukleinsäureextraktionsprozess mit dem MagNA Pure-System oder dem NucliSENS easyMAG entfernt Verunreinigungen effektiv aus den Proben, da die Nukleinsäuren während der Extraktion isoliert und gewaschen werden. Die internen Kontrollen machen den Endnutzer auf eine mögliche Hemmung der PCR aufmerksam; wenn das Target und die interne Kontrolle nicht detektiert werden, ist die Messung ungültig.

REPRODUZIERBARKEIT

Die Untersuchung zur Reproduzierbarkeit wurde auf zwei Integrated Cycler-Systemen durchgeführt – mit einem Bediener je System und zwei Läufen pro Tag über fünf Tage. Die Probengruppe zur Reproduzierbarkeit umfasste Kontrollen (NTC, HPC und LPC), Quantifizierungsstandards (QS-1 bis QS-5), negative Pools (Plasma- und Urinmatrix ohne Zusatz) und positive BKV-Pools in Plasma- und Urinmatrizen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen, d. h. einen schwach positiven Pool (Zusatzkonzentration von etwa der zwei- bis vierfachen Nachweisgrenze (LoD), einen mittelstarken Pool (etwa die 8- bis 10-fache LoD) und einen schwach positiven Pool (oberer Bestimmungsbereich des Assays). Für die Studie wurden vier Kopien jeder Panelprobe getestet, was für jedes Panelelement insgesamt 80 Bestimmungen ergab. Die Ergebnisse zur Reproduzierbarkeit jeder Panelprobe sind in der nachstehenden Tabelle aufgelistet.

Simplexa™ BKV – Reproduzierbarkeit									
					Standardabweichung				
Probenbezeichnung	**Erwartete Konzentration (Kopien/ml)**	**Geometrischer Mittelwert (Kopien/ml)**	**Log-Mittelwert (Kopien/ml)**	**Anzahl der Messergebnisse***	**Von System zu System**	**Von Tag zu Tag**	**Von Lauf zu Lauf**	**Innerhalb eines Laufs**	**Gesamt**
NTC	0	Nicht detektiert	Nicht detektiert	0	Nicht zutreffend (n. z.)				
HPC	$5{,}08 \times 10^7$	$4{,}81 \times 10^7$	7,682	74	0,026	0,012	0,025	0,024	0,045
LPC	$6{,}32 \times 10^3$	$6{,}44 \times 10^3$	3,809	80	0,014	0,034	0,015	0,045	0,060
QS-1	$4{,}70 \times 10^8$	$>1 \times 10^8$	n. z.	0	n. z.				
QS-2	$5{,}29 \times 10^6$	$5{,}35 \times 10^6$	6,728	79	0,016	0,021	0,024	0,024	0,043
QS-3	$2{,}74 \times 10^4$	$5{,}56 \times 10^4$	4,745	80	0,000	0,021	0,014	0,021	0,032
QS-4	$5{,}83 \times 10^3$	$5{,}89 \times 10^3$	3,770	80	0,005	0,025	0,017	0,047	0,056
QS-5	$1{,}05 \times 10^3$	$1{,}02 \times 10^3$	3,007	80	0,008	0,031	0,000	0,083	0,089
	Plasma								
Hochkonzentrierter Pool	$1{,}00 \times 10^7$	$9{,}11 \times 10^6$	6,960	74	0,016	0,009	0,026	0,019	0,037
Mittelstarker Pool	$5{,}00 \times 10^3$	$4{,}71 \times 10^3$	3,673	80	0,022	0,050	0,025	0,048	0,076
Schwachkonzentrierter Pool	$2{,}00 \times 10^3$	$1{,}44 \times 10^3$	3,158	80	0,063	0,050	0,000	0,098	0,126
Neg Pool	0	Nicht detektiert	Nicht detektiert	0	n. z.				

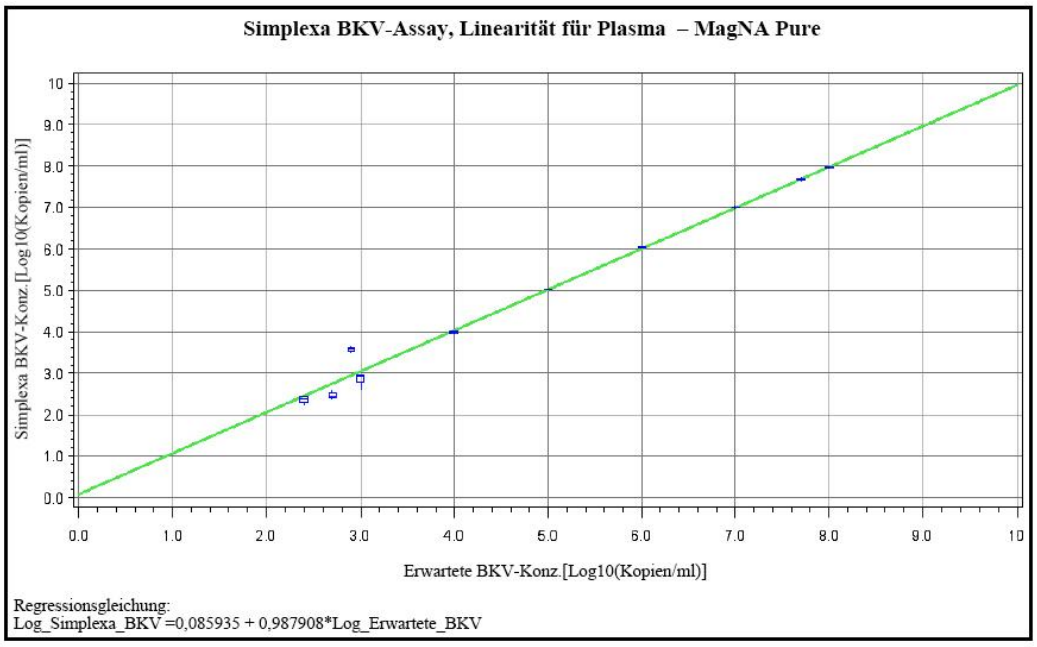
Simplexa™ BKV – Reproduzierbarkeit									
					Standardabweichung				
Probenbezeichnung	Erwartete Konzentration (Kopien/ml)	Geometrischer Mittelwert (Kopien/ml)	Log-Mittelwert (Kopien/ml)	Anzahl der Messergebnisse*	Von System zu System	Von Tag zu Tag	Von Lauf zu Lauf	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
	Urin								
Hochkonzentrierter Pool	1,00 x 10^7	5,75 x 10^6	6,760	80	0,000	0,104	0,014	0,013	0,105
Mittelstarker Pool	5,00 x 10^3	2,87 x 10^3	3,458	80	0,000	0,061	0,022	0,081	0,104
Schwachkonzentrierter Pool	2,00 x 10^3	1,12 x 10^3	3,048	79	0,088	0,049	0,000	0,090	0,135
Neg Pool	0	Nicht detektiert	Nicht detektiert	0	n. z.				

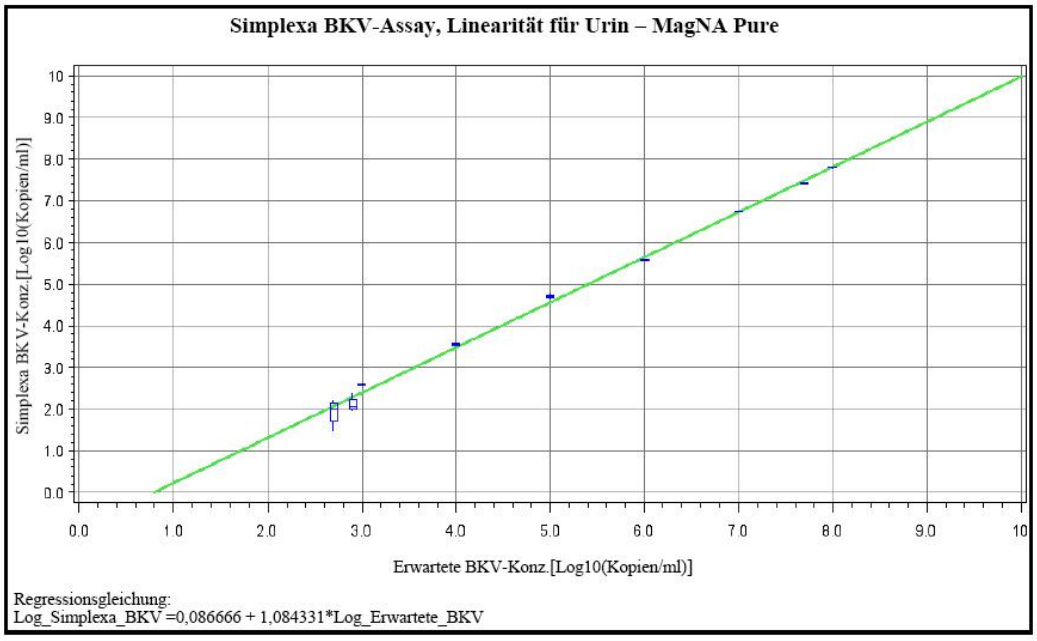
*** Anzahl der Ergebnisse innerhalb des linearen Bereiches des Simplexa BKV-Assays.**

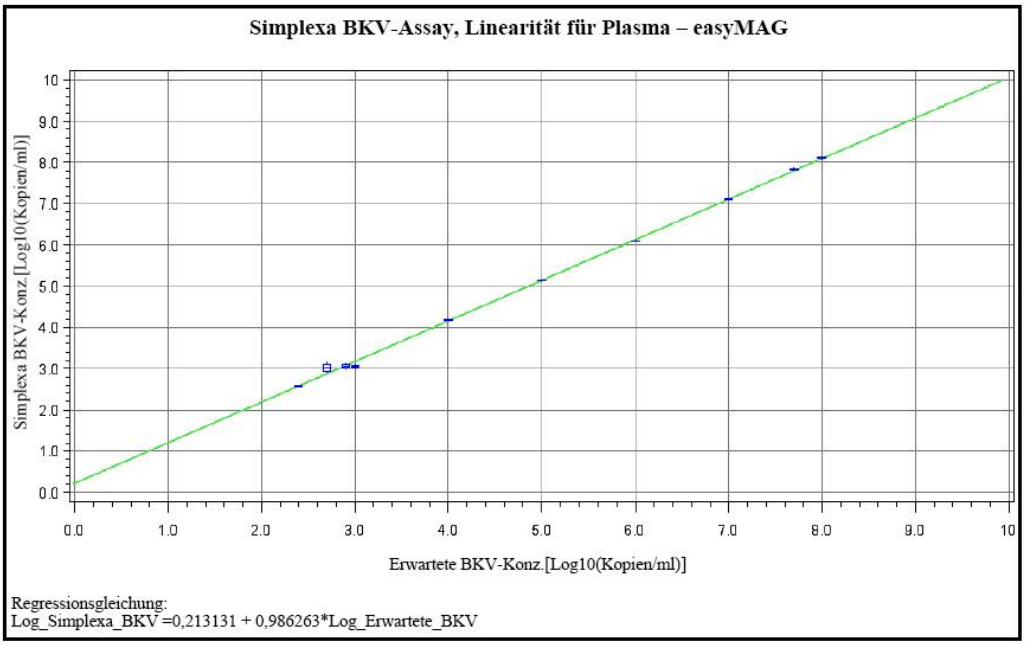
LINEARITÄT

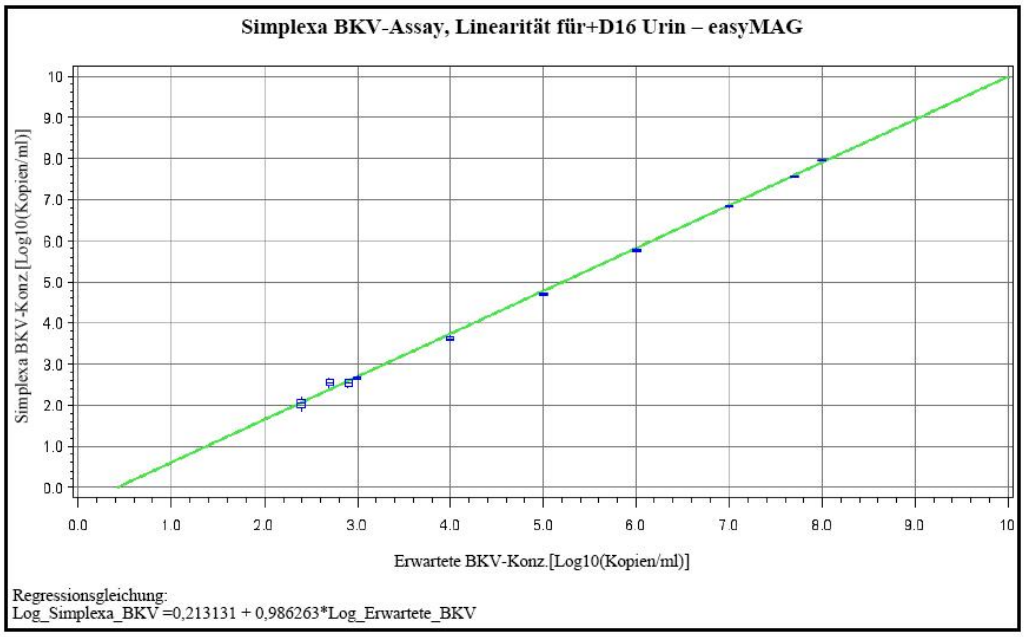
Die Bestimmung der Linearität erfolgte unter Verwendung von Proben, für die ein BKV-Stamm mit bekannter Bestandskonzentration einer klinisch negativen Urin- bzw. Plasmamatrix zugesetzt wurde. Die Probengruppe umfasste 10 Pools bekannter Kopienzahl, verteilt über den erwarteten linearen Bereich. Mindestens 3 Konzentrationen der Pools lagen an der Quantifizierungsuntergrenze (LLOQ), 2 lagen an der Quantifizierungsobergrenze (ULOQ) und die verbleibenden Pools verteilten sich etwa gleichmäßig zwischen der LLOQ und der ULOQ. Jede Probe wurde im Zufallsverfahren in mindestens 3 Replikaten getestet. Die Linearität wurde für jeden Probentyp mit jedem der beiden Extraktionsverfahren ermittelt. Die einzelnen Werte für den Messbereich sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

	Plasma		Urin	
	MagNA Pure	easyMag	MagNA Pure	easyMag
Kopien/ml	250 bis 1,00 × 10^8	250 bis 1,00 × 10^8	500 bis 1,00 × 10^8	250 bis 1,00 × 10^8




Simplexa BKV-Assay, Linearität für Urin – MagNA Pure
Simplexa BKV-Konz.[Log10(Kopien/ml)]
Erwartete BKV-Konz.[Log10(Kopien/ml)]
Regressionsgleichung:
Log_Simplexa_BKV =0,086666 + 1,084331*Log_Erwartete_BKV


Simplexa BKV-Assay, Linearität für Plasma – easyMAG
Simplexa BKV-Konz.[Log10(Kopien/ml)]
Erwartete BKV-Konz.[Log10(Kopien/ml)]
Regressionsgleichung:
Log_Simplexa_BKV =0,213131 + 0,986263*Log_Erwartete_BKV



MESSBEREICH

Alle Extraktionsverfahren und Probentypen waren bis zu einer Konzentration von 1×10^8 Kopien/ml linear. Der Messbereich des Assays wurde ausgehend von der Nachweisgrenze festgelegt, da diese höher war als die Untergrenze der Linearität, und lag damit zwischen $\geq$ 510 Kopien/ml und $\geq 1 \times 10^8$ Kopien/ml. Proben oberhalb des linearen Bereiches werden als $> 1 \times 10^8$ Kopien/ml ausgewiesen und Proben unterhalb von 510 als < 510 Kopien/ml. .

KONTAMINATION DURCH VERSCHLEPPUNG

Die Amplifikation von Verschleppungen wurde mit anderen Assays für das Gerät und die Universal Disc ermittelt. Die Studien zielten darauf ab, Kontaminationen in hoch negativen Proben festzustellen. Die Studie bestand daraus, eine hoch positive und eine hoch negative Probe abwechselnd auf jeder Disc zu platzieren. Der Verschleppungseffekt wurde durch Vergleich der beobachteten Negativrate für die hoch negative Probe mit der erwarteten Rate unter normalen Bedingungen der Testwiederholung bestimmt. In den bisherigen Untersuchungen wurde keine signifikante Kontamination durch Verschleppung festgestellt.

LITERATUR

1. Padgett, B.L. and Walker, D.L. (1973). "Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy". *J. Infect. Dis.* **127** (4): 467-470.
2. Shah KV, Daniel RW, Warszawski RM. High prevalence of antibodies to BK virus, an SV40-related papovavirus, in residents of Maryland. J Infect Dis 1973; 128:784.
3. Gardner SD. Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (B.K.). BMJ 1973; 1:77.
4. Mantyjarvi RA, Meurman OH, Vihma L, Berglund B. A human papovavirus (BK), biological properties and seroepidemiology. Ann Clin Res 1973; 5:283.
5. Flaegstad T, Ronne K, Filipe AR, Traavik T. Prevalence of anti BK virus antibody in Portugal and Norway. Scand J Infect Dis 1989;21(2):145-7.
6. Rziha HJ; Bornkamm GW; zur Hausen H. BK virus: I. Seroepidemiologic studies and serologic response to viral infection. Med Microbiol Immunol (Berl) 1978 Jul 4;165(2):73-81.
   AU Dei R; Marmo F; Corte D; Sampietro MG; Franceschini E; Urbano P
7. Age-related changes in the prevalence of precipitating antibodies to BK virus in infants and children. J Med Microbiol 1982 Aug;15(3):285-91.
8. Arthur RR, Shah KV. Occurrence and significance of papovaviruses BK and JC in the urine. Prog Med Virol 1989; 36:42.
9. Shah, KV. Polyomaviruses. IN: Virlogy (3rd Ed), Fields, BN, Knope, DM, Howley, PM (Eds), Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996. p. 2027.
10. Gillespie, SM, Chang, Y, Lemkp, G, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in persons infected with human immunodeficiency virus, San Francisco, 1981-1989. Ann Neurol 1991; 30:597.
11. NCCLS H18-A2. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline. 2nd Ed. (1999).
12. CDC-NIH Manual. (1999) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th ed. And National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of Laboratory Workers from Instruments, Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue (NCCLS M29-A).

Die Anwendung von Scorpions®-Sonden für Zwecke in Zusammenhang mit der *In-vitro*-Diagnostik beim Menschen ist durch eine Lizenz geschützt, die Focus Diagnostics, Inc. von DxS, Ltd. erworben hat. Die Farbstoffe Black Hole Quencher™, CAL Fluor™ und Quasar™ sind Marken der Biosearch Technologies, Inc. („BTI"). Die Black Hole Quencher, CAL Fluor- und Quasar-Farbstofftechnologie ist im Rahmen eines Vertrags mit BTI lizenziert, und diese Produkte werden ausschließlich für klinische, diagnostische oder Forschungs- und Entwicklungszwecke verkauft.

VERTRIEB DURCH:
mdi Europa GmbH, Langenhagener Str. 71 30855, Langenhagen-Hannover, Deutschland

PI.MOL2300.OUS.DE
Rev. E
Erstellungsdatum: 10. November 2014

BESTELLINFORMATIONEN

Telefon:	+1-800-838-4548 (nur USA)	+1-562-240-6500 (international)
Fax:	+1-562-240-6510	

TECHNISCHE HILFE

Telefon:	+1-800-838-4548 (nur USA)	+1-562-240-6500 (International)
Fax:	+1-562-240-6526	

Besuchen Sie unsere Webseite: www.focusdx.com

Cypress, California 90630 USA